

DELPHION

No active trail

Select GR**Stop Tracking****RESEARCH****PRODUCTS****INSIDE DELPHION****Log Out** **Work Files** **Saved Searches****My Account****Search:** Quick/Number Boolean Advanced Derwent**Help****Derwent Record** [Email this to a friend](#)**View:** [Expand Details](#) **Go to:** [Delphion Integrated View](#)**Tools:** [Add to Work File](#) [Create new Work File](#) 

- Derwent Title:** Preparation of a liver cell-derived packaging cell line comprises stabile transfection of adenoviral E1 sequences of human hepatoma cells
- Original Title:** ☒ DE19918023A1: Verfahren zur Herstellung von leberzellabgeleiteten Verpackungszelllinien und ihre Verwendung
- Assignee:** CICHON G Individual
- Inventor:** CICHON G; HILLGENBERG M; STRAUSS M;
- Accession/Update:** 2000-595134 / 200057
- IPC Code:** C12N 5/22 ; C12N 7/01 ;
- Derwent Classes:** B04; D16;
- Manual Codes:** B04-E03(Other DNA coding sequences) , B04-E04(Promoters, enhancers, regulatory sequences, upstream activating sequences) , B04-F02(Mammal (including human)) , B04-F1100E(Viruses (genetically engineered)) , B11-C09 (Other processes, appts.) , D05-H12F(Recombinant viruses [excluding viral vectors]) , D05-H14B2(Recombinant mammalian cells) , D05-H17A6 (Production of other specified wild-type protein)
- Derwent Abstract:** (DE19918023A) **Novelty** - A preparation of a liver cell-derived packaging cell line comprising stabile transfection of adenoviral E1 sequences of human hepatoma cells, is new.
Detailed Description - INDEPENDENT CLAIMS are also included for the following:
 (1) a preparation of liver-derived packaging cell line HuH7-E1-S, comprising adenoviral E1 sequences, human adenovirus serotype 5, or position 458-3533 of HuH7 cells, where the distant E1 promoter is replaced by beta -actin promoter by truncation;
 (2) packaging cell line HuH7- E1; and
 (3) packaging cell line HuH7-E1-S.
Use - The cell lines are used for preparing recombinant adenoviruses and adeno-associated viruses (claimed).
 Dwg.0/0
- Family:** PDF Patent Pub. Date Derwent Update Pages Language IPC Code
☒ DE19918023A1 * 2000-09-21 200057 3 German C12N 5/22
 Local appls.: DE1999001018023 Filed:1999-03-16 (99DE-1018023)

- INPADOC Legal Status:** [Show legal status actions](#)
- First Claim:** 1. Verfahren zur Herstellung von leberzellabgeleiteten Verpackungszelllinien durch stabile Transfektion adenoviraler E1 Sequenzen auf humanen Hepatoma-Zellen.
[Show all claims](#)
- Priority Number:**
- | Application Number | Filed | Original Title |
|--------------------|------------|----------------|
| DE1999001018023 | 1999-03-16 | |
- Chemical** [Show chemical indexing codes](#)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Indexing Codes:

Specific Compound Numbers:
Related Accessions:

[Show specific compounds](#)

Accession Number	Type	Derwent Update	Derwent Title
C2000-177915	C		
1 item found			

Title Terms: PREPARATION LIVER CELL DERIVATIVE PACKAGE CELL LINE COMPRISE TRANSFECTED SEQUENCE HUMAN HEPATOMA CELL

[Pricing](#) [Current charges](#)

Derwent Searches:	Boolean Accession/Number Advanced
-------------------	---

Data copyright Thomson Derwent 2003



Copyright © 1997-2005 The Thomson Corporation

[Subscriptions](#) | [Web Seminars](#) | [Privacy](#) | [Terms & Conditions](#) | [Site Map](#) | [Contact Us](#) | [Help](#)

THIS PAGE BLANK (USPTO)



⑮ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 199 18 023 A 1**

⑤① Int. Cl.⁷:
C 12 N 5/22
C 12 N 7/01

⑲ Aktenzeichen: 199 18 023.7
⑳ Anmeldetag: 16. 3. 1999
㉑ Offenlegungstag: 21. 9. 2000

DE 199 18 023 A 1

⑦① Anmelder:
Cichon, Günter, Dr.med., 10785 Berlin, DE

⑦④ Vertreter:
Baumbach, F., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., Pat.-Anw.,
13125 Berlin

⑦② Erfinder:
Cichon, Günter, Dr.med., 10785 Berlin, DE;
Hillgenberg, Moritz, 13347 Berlin, DE; Strauss,
Michael, Prof. Dr., 13156 Berlin, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

- ⑤④ Verfahren zur Herstellung von leberzellabgeleiteten Verpackungszelllinien und ihre Verwendung
⑤⑦ Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung neuer leberzellabgeleiteter Verpackungszelllinien und deren Verwendung zur Herstellung von rekombinanten Adenoviren und adenoassoziierten Viren.

DE 199 18 023 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung neuer leberzellabgeleiteter Verpackungszelllinien und deren Verwendung zur Herstellung von rekombinanten Adenoviren und adenoassoziierter Viren.

Die Gentherapie von Erkrankungen der Leber ist eine wichtige Zielstellung der molekularen Medizin, da sich in diesem Organ eine Vielzahl von genetischen Erkrankungen manifestieren.

Unter den viralen Vektorsystemen, die zur Lebergentherapie eingesetzt werden sollen, nehmen rekombinante Adenoviren (AV) und rekombinante adeno-assozierte Viren (AAV) einen besonderen Platz ein. Von allen zur Zeit in tierexperimentellen Untersuchungen eingesetzten Gentransfersystemen entfalten rekombinante Adenoviren die mit Abstand überzeugendsten in vivo Transferraten. Die Zahl der transient transduzierten Zellen (besonders bei Lebergentransfer) ist ausreichend um metabolische Störungen vollständig zu beheben. Die induzierten therapeutischen Effekte in der Leber sind jedoch zeitlich begrenzt (Wochen). Immunologische Abwehrreaktionen des Empfängers werden für die zeitliche Begrenzung der Expression verantwortlich gemacht. Zur Zeit werden große Anstrengungen unternommen die Antigenität adenoviraler Vektoren auf ein Minimum zu reduzieren. Adeno-assozierte Viren (AAV) sind von vorne herein weniger immunogen, darüber hinaus integrieren sie ihr Genom in einem gewissen Prozentsatz stabil in das Genom der Zielzelle. Das therapeutische Gen kann dadurch nicht mehr verloren gehen. Das Hauptproblem bei ihrem Einsatz sind die geringen Titer, in denen sie zur Zeit hergestellt werden können. Hier liegt der Schwerpunkt der Forschungsaktivität auf der Etablierung von Verfahren, die zu höheren Virusausbeuten führen.

Die Applikation rekombinanter Adenoviren zu medizinisch therapeutischen Zwecken stellt hohe Reinheitsanforderungen an die Virussuspensionen. Dies betrifft insbesondere mögliche Kontaminationen mit Wildtypadenoviren. Rekombinante Adenoviren tragen eine Deletion in der sogenannten E1 Region die eine Replikation in normalen Körperzellen (bzw. E1⁻-Zelllinien) verhindert. Ihre Vermehrung ist nur auf Zellen möglich, die in ihrem Genom die für die Replikation essentiellen E1 Gene tragen und dadurch zu sogenannten Verpackungszellen werden. Bestehen zwischen viralen E1-Sequenzen der Verpackungszelle und viralen Sequenzen im Vektor Homologien, so kann es zu Rekombination von Wildtypviren kommen. Es ist daher angestrebt in neuen adenoviralen Verpackungslinien Homologien soweit als möglich zu vermeiden.

Wildtypfreie Präparationen adeno-assoziierter Viren werden zur Zeit durch Cotransfektion zweier Plasmide auf eine E1 positive Verpackungslinie (293 Zellen) hergestellt. Die dabei verwendete Calciumphosphat-Coprazipitation ist als Gentransfermethode relativ ineffizient. Entsprechend sind die AAV-Titer, die auf diese Weise hergestellt werden niedrig. Der Einsatz von viralen Gentransfersystemen vermag den Transferanteil deutlich zu erhöhen und damit die Produktivität der Zelllinie zu erhöhen. Ein geeignetes virales Transfersystem sind rekombinante Baculoviren. Baculoviren infizieren präferentiell leberzellabgeleitete Zelllinien (Efficient gene transfer into human hepatocytes by baculovirus vectors, Hofmann et al.; 1995, 92 (22), pp.10099-103).

Etablierte adenovirale Verpackungslinien:

293-Zellen:

Die erste und lange Zeit einzige Zelllinie zur Produktion von E1⁻ Adenoviren sind 293 Zellen. 293 Zellen sind aus primären embryonalen Nierenzellen nach Immortalisierung durch stabile Expression adenoviraler E1 Gene hervorgegangen

(Characteristics of Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5, F. L. Graham and J. Smiley, J gen Virol (1977), 36, 59-72). Exakte Angaben über die in 293-Zellen integrierten viralen Gene existieren nicht. 293 Zellen tragen wahrscheinlich 12% vom 5' Ende des linearen Virusgenoms (in 4-5 Kopien) und 10% des 3' Endes (in 1 Kopie). 293-Zellen haben für die Haltung in Zellkultur günstige Wachstumseigenschaften und erlauben eine hochtitrige Produktion von E1⁻-Adenoviren. Sie besitzen jedoch den Nachteil, daß sie in ihrem Genom adenovirale Sequenzen tragen, die mit viralen Sequenzen im E1⁻-Vector identisch sind. Dies betrifft besonders den Bereich der das adenovirale Verpackungssignal enthält. Über diese homologen Sequenzen kann es zu einer Rekombination mit der möglichen Folge einer Wildtypvirusentstehung kommen. Die homologen Bereiche sind nicht essentiell für die Verpackungsfunktion und können entfernt werden. Die Produktion therapeutischer E1⁻-Adenoviren nach GMP Kriterien erfordert weitgehende Freiheit von Wildtypviren und macht die Etablierung neuer Zelllinien notwendig, in denen das Risiko von Wildtyprekombination so niedrig wie möglich gehalten werden soll.

Es existieren bislang noch drei weitere, nicht von 293 Zellen abgeleitete E1 positive Zelllinien bekannt, die zur Produktion von E1⁻-Viren verwendet werden können.

Imler und seine Kollegen haben eine Lungencarcinomlinie als Ausgangszelllinie verwendet (Novel complementation cell lines derived from human lung carcinoma A549 cells support the growth of E1-deleted adenoviruses vectors, J. L. Imler and M. Methali, Gene Therapy (1996), 3, 75-84). Das für die Etablierung der stabilen Linie verwendete E1-Konstrukt enthält kein Verpackungssignal mehr. Allerdings sind am 3' Ende noch 510 Basenpaare homolog zur Vektorsequenz, so daß hier eine homologe Rekombination theoretisch denkbar ist. Hinzu kommt eine Stopmutation im Leseraster des 55kd E1B Proteins, die dazu führt, daß kein E1B 55kd Protein im Zellysat mehr nachgewiesen werden kann und die antiapoptotische Wirkung wahrscheinlich auf das 19 kd Protein beschränkt.

Die zweite bekannte Linie ist durch Immortalisierung von humanen embryonalen Retinoblasten mit adenoviralen E1 Genen entstanden (Characterization of 911: A new helper cell line for the titration and Propagation of early region 1-deleted adenoviral vectors, J. F. Fallaux and A. J. von der Eb, Human Gene Therapy (1996), 7, 215-222). Bei dem zur Immortalisierung verwendeten E1 Konstrukt (Ad-XhoI) handelt es sich um ein Plasmid, das am 5' Endes das komplette Verpackungssignal und am 3' Ende über 2200 Basenpaare homologer Sequenzen enthält. Die Wahrscheinlichkeit einer Wildtyprekombination ist damit der in 293-Zellen vergleichbar.

Die dritte Zelllinie ist ebenfalls durch Immortalisierung von humanen embryonalen Retinoblasten entstanden (PER. C6: A novel helper cell line for RCA-free production of E1-deleted recombinant adenovirus vectors, F.J. Fallaux, R.C. Hoeben, Kongressbeitrag, Gene Therapy and Molecular Biology International Conference, Heraklion, Greece, 1997). Das verwendete E1-Konstrukt wurden am 5' und am 3' Ende in einer Weise trunziert, bei der keine Überlappung mit Vektorsequenzen mehr möglich ist. Die Zellen erlauben eine hochtitrige Virusproduktion und gewährleisten ein hohes Maß an Sicherheit vor Wildtyprekombinationen.

Die Aufgabe der Erfindung bestand deshalb darin, Verpackungszelllinien bereitzustellen, die die zur Virusreplikation notwendigen E1 Gene stabil in ihrem Genom tragen, leberzellabgeleitete Linien sind und in denen das Risiko von Wildtyprekombination so niedrig wie möglich gehalten werden kann. Darüber hinaus sollen sie sich neben Adenovi-

ren von einem zweiten viralen System, vorzugsweise Baculoviren, gut infizieren lassen, wobei dieses zweite System eine Helferfunktion erfüllt, indem es ermöglicht, daß trans-
sient zusätzliche Gene in die Verpackungszellen einge-
schleust werden, die zur Herstellung vollständig rekombina-
ter Adeno- bzw. adeno-assoziiierter Viren (AAV) präsent
sein müssen.

Es ist gelungen, Verpackungslinien, die diesen Anforder-
ungen genügen, aus humanen Hepatomalinen abzuleiten.
Als außergewöhnlich geeignet hat sich dabei eine aus einem
Hepatokarzinom abgeleitete Zelllinie erwiesen (HuH7-Zel-
len). Diese Zellen sind grundsätzlich über eine japanische
Zellbank zu beziehen (RCB 1366) Riken Cell Bank, 3-1-1
Koyadai, Tsukuba Science City, 305-0074 Japan), allerdings
sind diese Linien in zellbiologisch arbeitenden Laboratorien
auch in Deutschland von vorne herein sehr verbreitet. Durch
stabile Transfektion von adenoviralen Genen der E1 Region
werden diese Zellen zu produktiven Verpackungslinien für
E1 deletierte Adenoviren. Die auf dieser Basis etablierten
Zelllinien tragen den Namen HuH7-E1 und HuH7-E1-S.

Die Herstellung der HuH7-E1 Zellen erfolgt durch stabile
Transfektion adenoviraler E1 Sequenzen (humaner Adeno-
virus Serotyp 5, Positionen 79-5788) auf HuH7-Zellen.

Die HuH7-E1-S Zellen sind durch stabile Transfektion
der adenoviralen E1 Sequenzen (humaner Adenovirus Sero-
typ 5, Positionen 458-3533) auf HuH7 entstanden. Die
Funktion des durch Trunkierung entfernten E1 Promoters
wird durch einen beta-Actinpromoter ersetzt. Zur Generie-
rung der neuen Linien werden 500 ng eines Histidinolek-
tionmarkerplasmids mit je 5 µg der beschriebenen E1 Plas-
mide kotransfiziert. (Kalziumphosphatkopräzipitation auf
50-70% konfluente 6 cm Schalen mit HuH7 Zellen). Drei
Tage nach Transfektion werden die Zellen trypsiniert, in T25
Schalen umgesetzt und die Selektion gegen Histidinol
(4 mM Endkonzentration) begonnen. 4 Wochen nach Trans-
fektion werden Einzelklone isoliert, verbreitert und auf ihre
Fähigkeit zur E1-Expression und Unterstützung der Ad-Re-
plikation getestet.

Vorteile der etablierten Zellen

a) HuH7-E1: Diese Zellen zeigen eine sehr gute Infizier-
barkeit durch Adenoviren und Baculoviren (Helfervirus)
und unterstützen darüber hinaus die Replikation E1 deletier-
ter Adenoviren (durch die Anwesenheit von E1 Genen). Mit
diesen drei Eigenschaften ist die notwendige Voraussetzung
gegeben, um als Verpackungslinie für die Herstellung voll-
ständig rekombinanter Adenoviren und adeno-assoziiierter
Viren dienen zu können. Die Transgenexpression (E1) bleibt
auch in Abwesenheit von Selektionsbedingungen stabil
(mind. 15 Passagen), was die Haltung und die Nutzung zur
Großproduktion viraler Vektoren erleichtert. HuH7-E1 sind
frei von Sequenzen folgender potentiell humanpathogener
Viren: Hep B, Hep C, Cytomegalie und EBV. Dadurch kön-
nen diese Zellen auch zur Herstellung von Viren genutzt
werden, die GMP Anforderungen entsprechen.

b) HuH7-E1-S: Für diese Zellen gelten alle Vorteile von
HuH7-E1 Zellen. Darüber hinaus ist beim Einsatz dieser
Zellen die Wahrscheinlichkeit einer Wildtyprekombination
durch die Trunkierung der (stabil exprimierten) E1 Region
deutlich vermindert. Mit der Trunkierung ist jedoch eine ge-
ringfügig verringerte Virusproduktivität verbunden. Auch
diese Linie kann prinzipiell zur GMP Produktion eingesetzt
werden.

Von der Bedeutung möglicher Wildtypkontaminationen
für wissenschaftliche und medizinische Fragestellung hängt
die Entscheidung für die Nutzung der einen oder anderen Li-
nie ab.

HuH7-E1 Zellen und HuH7-E1-S sind wahrscheinlich die
einzigen zur Zeit existierenden leberzellabgeleiteten Ver-
packungslinien zur Herstellung rekombinanter Adeno- und
adeno-assoziiierter Viren.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von leberzellabgeleiteten
Verpackungzelllinien durch stabile Transfektion ade-
noviraler E1 Sequenzen auf humanen Hepatoma-Zel-
len.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,
daß HuH7-Zellen eingesetzt werden.
3. Verfahren zur Herstellung einer leberzellabgeleite-
ten Verpackungzelllinie HuH7-E1 nach Anspruch 2,
gekennzeichnet durch stabile Transfektion adenovira-
ler E1 Sequenzen, humaner Adenovirus Serotyp 5, Po-
sitionen 79-5788, auf HuH7-Zellen.
4. Verfahren zur Herstellung einer leberzellabgeleite-
ten Verpackungzelllinie HuH7-E1-S, gekennzeichnet
durch stabile Transfektion adenoviraler E1 Sequenzen,
humaner Adenovirus Serotyp 5, Positionen 458-3533,
auf HuH7-Zellen, wobei der durch Trunkierung ent-
fernte E1 Promoter durch einen beta-Actinpromoter er-
setzt wird.
5. Verpackungzelllinie HuH7-E1.
6. Verpackungzelllinie HuH7-E1-S.
7. Verwendung einer Verpackungslinie gemäß einem
der Ansprüche 1 bis 6 zur Herstellung von rekombi-
nanten Adenoviren.
8. Verwendung einer Verpackungslinie gemäß einem
der Ansprüche 1 bis 6 zur Herstellung von adeno-asso-
ziierten Viren.

- Leerseite -